抗蟲基因轉殖作物之研發

林鳳琪

自古以來人們就有改造物種的願望，拜現代生物科技進步之賜，自 1983 年開始，科學家研究以農桿菌 Ti 質體作為載體，將外來的基因轉殖入植物染色體中讓植物表現新特性(Caplan *et al*., 1983)，因此，根據人類意志改變遺傳物質，而創造更高價值的動植物品種已不再是遙不可及的夢想。二十年來，運用基因轉殖技術使植物表現出新的特性，歸納分別具有增加營養成份、耐殺草劑、抗蟲、抗病、雄不捻、顏色改變、延遲老化、抗逆境等。因為能提高產量與可利用性，已經成為作物生產上的一項重大改變。

自 1994 年美國第一個基因轉改造的番茄上市，至 2004 年全球栽培基因轉殖作物的面積約 8100 萬公頃，而其中為解決栽培作物上害蟲問題而種植抗蟲基因作物約占 30%。科學家將不同的基因轉殖入作物，使作物含有抗蟲物質，在眾多研究發展中，最主要的抗蟲物質可分為：蘇力菌內毒素、凝集素、酵素抑制物、酵素等類別。

抗蟲基因轉殖植物的發展，使植物依靠自有的能力抵禦害蟲，與傳統利用殺蟲劑相較，改種抗蟲基因轉殖作物不但不必擔心農藥效果受天候之影響，反而因害蟲得以控制，故而不須施用或是減少施用殺蟲藥劑，降低生產成本，也減少附近水源或食物中以及土壤中殺蟲劑殘存的毒性，有助於自然環境生態之維護與發展。

台灣目前並無核准任何抗蟲基因轉殖作物栽種在田間，但衛生署核准多種進口的抗蟲基因轉殖食品，其中以玉米為最大宗，均為單獨轉殖 Bt 毒蛋白或同時具耐殺草劑(嘉磷賽、固殺草)基因的玉米種子，作為畜牧業用飼料所用，(http://food.doh.gov.tw/chinese/info/gmo4.htm)。因此，社會大眾在日常生活中或多或少都可能接觸基因轉殖食品。

抗蟲基因轉殖植物發展現況

農業試驗所應用動物組王清玲博士等曾在 2004 年撰文，詳細介紹全球抗蟲基因轉殖植物的發展現況，因此本文不再詳細贅述，整理簡述目前發展概況。

一、蘇力菌內毒素蛋白

在四大抗蟲物質中，首先被成功研發之植物為具蘇力菌(*Bacillus thuringiensis* Berliner, Bt) 內毒素的轉殖作物 (Hilder, 1987 ; Veack *et al*., 1987) ，這些被稱為 Bt 植物是目前唯一商業化且大量生產栽培的抗蟲基因轉殖作物，主要是防治鱗翅目或鞘翅目害蟲，尤其是 Bt 玉米及棉花為大宗，用以防治玉米穗蟲、甜菜夜蛾、玉米螟、菸草夜蛾、科羅拉多金花蟲 等(王等 2004)。用於轉殖蘇力菌毒蛋白的品系包括 *cry1*、*cry2*、*cry3* 及 *cry4* 等基因， *cry1* 對鱗翅目、*cry2* 對鱗翅目與雙翅目、*cry3* 對鞘翅目及 *cry4* 對雙翅目的昆蟲有毒效。其中以 *cry 1* 應用最普遍，又再分為多種不同品系，各品系產生不同之毒蛋白，對不同種類的鱗翅目昆蟲各具不同程度的毒性，*cry1Ab* 是其中最常應用的一種。目前許多生物科技公司積極開發殖入雙重基因，使作物同時表現兩種新特性，如 Aventis 公司研發出一種玉米，即同時殖入蘇力菌毒蛋白 *cry9C* 與抗嘉磷賽(glyphosate)殺草劑的基因，因此對歐洲玉米螟與嘉磷賽殺草劑均具抗性。孟山都(Monsanto)公司將蘇力菌毒蛋白 *cry3A* 基因及抗病毒基因同時殖入馬鈴薯，使其同時可以抗科羅拉多金花蟲與病毒病(Potato Leaf Roll Virus 或 Potato Virus Y) (Cornell University, 2004)。

台灣各大學及研究試驗單位多位研究人員也致力於開發本土的 Bt 植物轉殖或改良Bt 菌株的殺蟲效果， 例如將蘇力菌臺灣分離株 E 9-11 之 cry1 Ac 基因，以 PCR 增幅等方法，轉殖菌株成功表現出 130 kDa 蛋白質產物，(曾等, 2002) ，該轉殖菌對小菜蛾幼蟲效果較遲緩、但後續具良好的殺蟲活性。或以 PCR 的技術，對蘇力菌台灣分離株 D4-01，進行 *cry 1Ac* 型毒蛋白 基因的全長增幅，隨後接入載體 yT&A，成為質體 p1AcTA1 。並以電穿孔法送入 無質體之蘇力菌 Cry - B 中，得到轉殖的蘇力菌株 1Ac 5SB 。此一轉殖具良好的殺蟲活性， 處理擬

尺蠖(*Trichoplusia ni*) 2 齡幼蟲及小菜蛾 (*Plutella xylostella*)3 齡幼蟲，72 小時後，可達 80 ～ 90% 的致死率(陳, 2006)。此外在芥藍菜嫩葉上篩選出本土葉表生菌(*Erwinia herbicola*)中轉殖入蘇力菌(*Bacillus thuringiensis*)基因 cry1Aa1 的質體，得到的轉殖株總蛋白質抽出物，在濃度為 2.5 mg/ml 下，餵食小菜蛾三齡幼蟲 72 小時後，幾乎可達到 100 % 的死亡率。使 *Erwinia herbicola* 不但具有抗火燒(fire blight)病原菌 *Erwinia amylovora* 的生長，同時具抗蟲的效果，提高 *E. herbicola* 在經濟作物保護上的利用價值(林等, 2002)

二、 凝集素(Lectins)

植物凝集素重要作用之一就是避免植物受到其他動物或昆蟲侵害，是一種植物防禦蛋白(defensive protein)或稱為殺蟲蛋白(insecticidal protein)。尤其是在豆類種子中普遍存在這種抗蟲物質，相關化學研究甚為廣泛且深入，例如菜豆(*Phaseolus vulgaris* L.)種子已經分離出至少 10 種不同結構與性質之凝集素 Hamelryck *et al*., 1996)。昆蟲取食含有凝集素成份的植物後，凝集素與昆蟲腸道尤其是中腸壁之醣蛋白結合，使腸道的生理代謝作用受到抑制，無法正常吸收營養成分，腸壁的絨毛組織崩解破壞，引發病灶，導致消化道內細菌增殖，造成傷害。中毒昆蟲會出現進食停滯、攝食減少、體重無法正常增加等現象

目前研究最多的的凝集素有小麥凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)基因及或自石蒜科(Amaryllidaceae)雪花蓮(snowdrop, *Galanthus nivalis* L.)所分離出的凝集素(Snowdrop lectin, *Galanthus nivalis* agglutinin, GNA)。在小麥凝集素殖入玉米中，可以防治歐洲玉米螟(*Ostrinia nubilabis* (Hübner))與鞘翅目金花蟲科的胡瓜斑甲蟲(*Diabrotica undecimpunctata* Mannerheim)(Czapla and Lang, 1990)。雪花蓮凝集素殖入水稻、菸草、馬鈴薯及小麥等作物，對於某些鱗翅目害蟲如蛾類與同翅目害蟲如蚜蟲、飛蝨類有抑制作用(Down *et al*. 1996; Fitches *et al*., 1997; Foissac *et al*., 2000; Gatehouse *et al*., 1997; Powell *et al*., 1993; Stoger *et al*., 1999)。

中央研究院研究人員自抗蟲綠豆品系(VC6089A)分離出 VrD1 的防

禦素，含豐富的半胱胺酸的蛋白質，亦稱為 VrCRP 是目前唯一兼具抗病原菌及抗蟲害功能的防禦素(陳, 2005)。並嘗試以將 VrCRP 基因轉殖到蕃茄，培育具抗病蟲害的新品種蕃茄。

三、 酵素抑制物 (Enzyme inhibitors)

具抗蟲效果的酵素抑制物包括：蛋白酶抑制物 (Protease inhibitor)，澱粉酶抑制物(α-amylase inhibitor)，其中以蛋白酶抑制物研發應用最為普遍，如 serine 蛋白酶抑制物質的胰蛋白酶抑制物 (trypsin inhibitor)，該成分在豆類種子中尤其普遍。昆蟲消化道內原有胰蛋白酶 trypsin，作用於蛋白質，分解蛋白質成小分子生鏈(peptides)，再經 peptidase 作用，生成氨基酸類。此蛋白酶抑制物質被昆蟲食入後，蛋白酶就會失去功能，以致蛋白質無法分解，昆蟲無法吸收蛋白質營養成分。應用基因轉殖技術，使作物具有生成此抑制物的表現基因，作物即具有抗蟲性。

目前研發將翼豆(winged bean)或大豆的胰蛋白酶抑制基因轉殖入水稻，可以抗拒二化螟 (*Chilo suppresalis* (Walker))(Duan *et al.*, 1996; Mochizuki *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1996)及褐飛蝨(*Nilaparvata lugens* Stal) 幼蟲有抑制作用。大麥種子中 trypsin inhibitors 基因轉殖至小麥 (*Triticum aestivum* L.)，對麥蛾(*Sitotroga cerealella* (Olivier))幼蟲的生長有抑制作用。將芥菜的 trypsin inhibitors 轉殖至菸草、芥菜 (Arabidopsis)、油菜(oilseed rape)，對於小菜蛾(*Plutella xylostella* (L.))、夜盜蟲(*Mamestra brassicae* (L.))及 *Spodoptera littoralis* (Boisduval)有不同程度之毒性(De Leo *et al.*, 2001)。轉殖綠豆的 trypsin inhibitors 馬鈴薯植株，使葉片含有 TI 為可溶性蛋白質約 1%的濃度，可使番茄淡紋褐翅夜蛾(*Lacanobia oleracea1* (L.))幼蟲體重減輕，各齡蟲發育時間均延緩，整體生長發育受到抑制作用。

台灣研發將台農 57 號甘藷的胰蛋白酶抑制物殖入煙草，將使斜紋夜盜蟲(*Spodoptera litura* (F.))幼蟲生長緩慢，體重與存活率均顯著降低 (Yeh *et al.*, 1997)。除嘗試將甘藷的抗蟲基因轉殖至十字花科蔬菜，亦將此抗蟲物質轉殖入菊花上，初步測試結果轉殖株被斜紋葉盜幼蟲取的食面積較對照小。

四、酵素(Enzymes)

此類抗蟲物質主要包括：幾丁質分解酶(Chitinase)及膽固醇氧化酶(Cholesterol oxidase)。若植物會產生幾丁質分解酶，被昆蟲取食後，對其外骨骼部分作用較輕微，主要毒害是發生於昆蟲中腸壁對圍食膜的破壞。膽固醇氧化酶則來自細菌中，其效用則是破壞昆蟲消化道細胞的細胞膜。

目前自菸草天蛾(*Manduca Sexta* (L.))體內分離出三種幾丁酶，(Zhu *et al*., 2001)，其中一種轉殖於馬鈴薯後，葉片含有該成份對於象鼻蟲(*Oryzaephilis mercator* (Fauvel)幼蟲及番茄淡紋褐眼夜蛾幼蟲(*Lacanobia oleracea* (L.))有致死效果(Wang *et al*., 1996; Gatehouse *et al*., 1997)。或者來自鏈球菌 *Streptomyces albidoflavus* 的 chitinolytic enzymes (endochitinase and chitobiosidase)殖入番茄，可以減緩擬尺蠖(*Trichoplusia ni* (Hübner))幼蟲生長速度，使死亡率增加(Gongora *et al*., 2001)。

膽固醇氧化酶對某些棉花鱗翅目害蟲，如菸芽夜蛾(*Heliothis virescens* (F.))，美洲棉鈴蟲(*Helioverpa zea* (Boddie)), 紅鈴蟲(*Pectinophora gossypiella* (Saunders))，亦有某種程度的抑制功效(Greenplate *et al*. 1997)。

未來展望

作物抗蟲相關的轉殖技術研究頗多，除上述幾種較為顯著的抗蟲成分外，研究人員仍不斷努力篩選，尋求其他可能的化學抗蟲物質。迄今商業化大面積栽植仍侷限於蘇力菌毒蛋白的轉殖作物。由於受作物類別與栽種面積的限制、或有不利於人畜健康的疑慮、或是田間防蟲效果未達足堪應用階段等因素限制，其他蘇力菌毒蛋白以外的轉殖作物，目前尚未有商業化栽植的品種生產，但是這些藉由轉殖技術而表現不同抗蟲機制的作物，在研究人員孳孳努力下，技術與成果日新月異，未來的發展仍深具潛力。除化學抗蟲物質，根據傳統育種的理念，篩選具物理抗蟲機制的植物基因，發展基因轉植技術，改造作物

使其增加葉面葉毛密度讓害蟲無法棲息於植物上，或者增加葉毛的高度，致害蟲的口器無法刺吸危害植物，甚至對一些具傳播病毒的媒介昆蟲如粉蝨或薊馬，可以達到阻斷其傳播植物病毒的途徑，未嘗不是開發抗蟲基因轉殖植物的另一方向。

基因轉殖作物固然帶給人類農業耕作上的便利，但也可能對生態環境產生負面影響，例如抗殺草劑作物的種植，若導致某種類型殺草劑過量使用，可能減少某些野生植物的種類，如這種改變使某些昆蟲棲所與食物減少，將使這些昆蟲族群面臨生存壓力或是面臨滅絕的威脅。基於對於「改性活生物體」(Living modified organism，包括基因轉殖生物)可能對地球上生物資源有不利影響，在聯合國生物多樣性公約組織主導下，全體締約國於 2000 年決議通過「卡塔赫納生物安全議定書」，表明關切現代生物技術的迅速拓展，可能對生物多樣性產生不利的影響，約定於發展生物技術的同時，對改性活生物體的轉移、處理與使用，應採取妥善的安全措施，以確保人類健康與生物多樣性之安全。此議定書的通過，更加強國際間於風險評估時對生物多樣性影響之重視。我國在 2005 年六月公佈的「基因轉殖植物隔離田間試驗管理辦法」中，亦有關於環境安全評估的規定，對於提出評估申請、評估的程序與方法等，有原則性之規範。而基因轉殖植物即使通過評估而釋出種植，其對於環境生態系之長期影響，仍需要做持續的追蹤監控，一旦發現有不利於環境生態的情形，立即採取管制或禁止之措施，才可能使基因轉殖植物對環境產生破壞之風險降至最低。希望能在獲取現代科技所衍生利益的同時，盡量避免對環境生態造成任何負面影響，基因轉殖作物方可永續之經營。

參考文獻

王清玲、林鳳琪、林俊義。2004。抗蟲基因轉殖植物之類別與其對環境中昆蟲類之影響。植保會刊：46: 181-209。

林志輝、黄文忠、曾經洲、陳良築。2002。含蘇力菌毒素基因 cry1Aa1 之轉形葉表生菌 Erwinia herbicola 的殺蟲活性與質體留存之分析　植保會刊　44：21-36。

陳韋如、李國欽、高穗生、曾耀銘、曾經洲。 2006。台灣蘇力菌 *cry 1A c5* 殺蟲 基因選殖及表現 植保會刊 48：17- 30。

陳慶三。2005。抗蟲蛋白質。科學發展。392: 12-15。

曾經洲、高穗生、陳良築、翟建富、侯豐男。2002。蘇力菌臺灣分離株 cry1Ac 基因之選殖及表現測試　植保會刊　44：185－208。

Caplan, A., L Herrera-Estrella, D. Inze, E. van Haute, and M. van Montagu. 1983. Introduction of genetic material into plant cells *Agrobacterium tumefaciens*, plant vector, genetic engineering. Science 222: 815-821.

Cornell University. 2004. Bt-based insect resistance. Genetically Engineered Organisms. Public Issues Education. http:// www.comm.cornell.edu/gmo/traits/

Czapla, T. H., and, B. A. Lang.1990. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer and southern corn rootworm. J. Econ. Entomol. 83: 480-2485.

De Leo, F., M. Bonade-Bottino, L. R. Ceco, R. Gallerani, and L. Jouanin. 2001. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. Insect Biochemistry and Molecular Biology (UK) 31: 593-602.

Down, R. E., A. M. R. Gatehouse, W. D. O. Hamilton, and J. A. Gatehouse. 1996. Snowdrop lectin inhibits development and decreases fecundity of the glasshouse potato aphid (*Aulacorthum solani*) when administered in vitro and via transgenic plants both in laboratory and glasshouse trials. J. Insect Physiol. 42: 1035-1045.

Duan, X., X. Li., Q. Xue, M. Abo-El-Saad, D. Xu, and R. Wu. 1996. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibiter II gene are insect resistant. Nature Biotechnol. 14: 494-498.

Fitches, E., A. M. R. Gatehouse, and J. A. Gatehouse. 1997. Effects of snowdrop lectin (GNA) delivered via artificial diet and transgenic plants on the development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) larvae in laboratory and glasshouse trials. J. Insect Physiology (UK) 43: 727-739.

Foissac, X., T. L. Nguyen, P. Christou, A. M. R. Gatehouse, and J. A. Gatehouse. 2000. Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin. J. Insect Physiol. 46: 573-583.

Gatehouse, A. M., G. M. Davison, C. A. Newell, A. Merryweather, W. D. O. Hamilton, E. P. J. Burgess, R. J. C. Gilbert, and J. A. Gatehouse. 1997. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trials. Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement 3: 49-63.

Gongora, C. E., S. Wang, R. V. Barbehenn, and R. M. Broadway. 2001. Chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus* expressed in tomato plants: effects on *Trichoplusia ni*. Entomol. Exp. Appl. 99: 193-204.

Greenplate, J. T., D. R. Corbin, and J. P. Purcell. 1997. Cholesterol oxidase: potent boll weevil larvicidal and oostatic agent suitable for transgenic cotton development. Proceedings (Memphis, Tenn.: National Cotton Council of America) 2: 877-880.

Hamelryck, T. W., F. Poortmans, A. Goossens, G. Angenon, M. van Montagu, L. Wyns, and R. Loris. 1996. Crystal structure of Arcelin-5, a lectin-like defense protein form *Phaseolus vulgaris*. J. Biological Chemistry 271: 32796-32802.

Hilbeck, A., W. J. Moar, M. Pusztai-Carey, A. Filippini, and F. Bigleri. 1998. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). Environ. Entomol. 27: 1255-1263.

Hilder, V.A., A. M. R Gatehouse, S. E. Sheerman, R. F. Barker. and D. Boulter. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature 330: 160-163.

Mochizuki, A., Y. Nishizawa, H. Onodera, Y. Tabei, S. Toki, Y. Habu, M. Ugaki, and Y. Ohashi. 1999. Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice stem borers, *Chilo suppressalis*. Entomol. Exp. Appl. 93: 173-178.

Powell, K. S., A. M. R. Gatehouse, V. A. Hilder, and J. A. Gatehouse. 1993. Antimetabolic effects of plant lectins and plant and fungal enzymes on the nymphal stages of two important rice pests, *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix cinciteps*. Entomol. Exp. Appl. 66, 119-126.

Stoger, E., S. Williams. P. Christou, R. E. Down, and J. A. Gatehouse. 1999. Expression of the insecticidal lectin from snowdrop in transgenic wheat plants: effects on predation by the grain aphids *Sitobion avenae*. Molecular Breeding: New Strategies in Plant Improvement 5: 65-73.

Vaeck, M., A. Reynaerts, H Hofte, S. Jansens, M. De Beuckeleer, C. Dean, M. Zabeau, M. van Montagu, and J. Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. Nature 328: 33-37.

Wang, X., X. Ding, B. Gopalakrishnan, T. D. Morgan, J L. ohnson, F. White, S. Muthukrishnan, and K. J. Kramer. 1996. Characterization of a 46 kDa insect chitinase from transgenic tobacco. Insect Biochem. Mol. Biol. 26: 1055-1064.

Xu, D., Q. Xue, D. McElroy, Y. Mawal, V. A. Hilder , and R.Wu. 1996. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTi, transgenetic rice plants confers to two major rice insect pests. Mol. Breed. 2: 167-173.

Yeh, K. W., M. I. .Lin, S. J. Tuan, Y. M. Chen, C. Y. Lin, and S. S. Kao. 1997. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. Plant Cell Reports 16: 696-699.

Zhu, X., H. Zhang, T. Fukamizo, S. Muthukrishnan, and K. J. Kramer. 2001. Properties of *Manduca Sexta* chitinase and its C-terminal deletions. Insect Biochemistry and Molecular Biology (UK) 31: 1221-1230.